豌豆蚜唾液蛋白家族的克隆及在不同发育阶段的表达

张　燕[1]，吴国星[3]，郭　昆[4]，王　炜[2]，丁旭坡[3]，宋希明[2]，许永玉[1,*]，崔　峰[2,*]

(1. 山东农业大学植物保护学院，山东泰安 271018；2. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100101；3. 云南农业大学植物保护学院，昆明 650201；4. 中国医学科学院药用植物研究所，北京 100193)

摘要：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 是一种重要的刺吸式害虫，其分泌的唾液对取食寄主植物和传播植物病毒有重要的作用。为了探讨蚜虫唾液蛋白的功能，本研究克隆了在豌豆蚜唾液腺高表达的一个未知功能的蛋白家族，该家族包括 13 个基因，编码 14 种蛋白，其中 4 个基因在唾液腺高表达。这个家族是蚜虫特有的蛋白家族，富含半胱氨酸，有 14 个半胱氨酸高度保守，其中 6 个半胱氨酸形成 3 个保守的 CXXC 结构域。通过与基因组比对，发现这个家族的基因没有内含子，分布在基因组的 9 个 scaffold 上。用半定量逆转录 PCR 检测了每个成员在豌豆蚜不同发育阶段的表达，结果显示这个家族没有发育阶段特异性。推测这个家族的表达可能具有组织特异性，有氧化还原酶或 DNA 甲基化酶的功能。

关键词：豌豆蚜；蛋白家族；唾液蛋白；发育阶段；基因克隆；基因表达

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)12-1445-07

Cloning and expression profiling of a saliva protein family at different developmental stages in *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae)

ZHANG Yan[1], WU Guo-Xing[3], GUO Kun[4], WANG Wei[2], DING Xu-Po[3], SONG Xi-Ming[2], XU Yong-Yu[1,*], CUI Feng[2,*] (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, is an important piercing-sucking pest. The secreted saliva plays roles in feeding host plants and virus transmission. In order to explore the function of saliva proteins, we cloned an unknown protein family that is highly expressed in salivary glands of the pea aphid. The family consists of 13 genes, which encode 14 proteins, and four of them are highly expressed in salivary glands. The family is unique to aphids and enriched in cysteine. Fourteen cysteines are conserved, 6 of which form three CXXC domains. Genes of this family have no introns and are distributed in 9 scaffolds of the aphid genome. Semi-quantitative reverse transcription PCR showed that there was no stage-specific expression for this family. We speculate that the expression of this family may be tissue-specific and this protein family probably has the functions of oxidoreductases or DNA methyltransferases.

Key words: *Acyrthosiphon pisum*; protein family; saliva proteins; developmental stage; gene cloning; gene expression

近年来，在植食昆虫与植物互作的两级关系中，人们开始越来越多地关注植食昆虫唾液所起的作用(殷海娣等,2006)，特别是刺吸式昆虫，由于其唾液既可以帮助昆虫克服植物的防御方应，又与传播植物病毒和诱导植物病理反应有关，更是极大地激发了人们的研究热情。刺吸式昆虫在不同的发

基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-N-05)；公益性行业(农业)科研专项(201103022)

作者简介：张燕，女，1984 年生，山东泰安人，硕士研究生，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E-mail：mili05@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail：xuyy@sdau.edu.cn；cuif@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2011-07-12；接受日期 Accepted：2011-09-28

育历期中，其唾液成分也会发生改变来满足不同龄期的适应需要，如麦扁盾蝽 *Eurygaster integriceps* 1 龄若虫并不取食，因此其唾液中几乎不含有淀粉酶，当虫龄增长、取食增多时，其唾液中的淀粉酶活性也逐渐增强（Kazzazi *et al*., 2005）。双翅目黑森瘿蚊 *Mayetiola destructor*（Say）在发育早期唾液中有多种分泌蛋白，而这个阶段恰恰决定了黑森瘿蚊是否能在植物上存活，由此可见黑森瘿蚊正是利用了唾液中丰富的蛋白组分来应对植物的抗性反应（Chen *et al*., 2004；殷海娣等，2006）。迄今的研究表明，刺吸式昆虫会根据不同的寄主植物和不同的生理需要，通过唾液组分的改变，来达到取食和发育的目的（严盈等，2008）。

豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*（半翅目：蚜科）是一种重要的农业害虫，为害香豌豆、豌豆、蚕豆、苜蓿、草木犀、大豆等草本豆科植物，常以若虫和胎生雌虫为害豆科植物的嫩茎、叶面、花和幼果，影响生长发育和观赏。另外，豌豆蚜还可以传播多种植物病毒，对农业生产造成重大损失。目前，豌豆蚜作为模式蚜虫其基因组测序已完成（The International Aphid Genomics Consortium, 2010），也构建了唾液腺的 EST 文库和蛋白质组（Carolan *et al*., 2011），为研究蚜虫与植物互作、蚜虫与病毒互作的分子机理奠定了基础。

在豌豆蚜唾液腺 EST 文库中有 4 个高表达的基因（Carolan *et al*., 2011），其编码的蛋白功能未知，相似的序列特征表明它们属于一个家族。通过搜索基因组，我们发现了这个家族另外 9 个成员。本研究从中国的一个豌豆蚜种群克隆了这个家族的各个成员，分析了其序列特征和进化关系，利用半定量逆转录聚合酶链式反应（semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction, Semi-QRT-PCR）技术检测各个成员在蚜虫不同发育阶段的表达，初步探讨这个蛋白家族可能的生物学功能，为将来探讨该家族在蚜虫与植物互作、蚜虫与病毒互作中发挥的作用提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆蚜 *A. pisum* 采自云南玉溪的豌豆 *Pisum sativum*，在智能人工气候箱（温度 21 ± 1℃，RH 60% ± 5%，光周期 16L∶8D）的养虫笼（40 cm × 40 cm × 40 cm）内用蚕豆 *Vicia faba* 苗饲养。取一头健康成蚜，单独放在一养虫笼内繁殖，获得单雌系，使试虫遗传背景一致。将刚出生的若蚜在 23℃ 下分别饲养 1，2，4，6 和 8 d，获得 1，2，3 和 4 龄的若蚜及成蚜（宫亚军等，2006）。每个龄期的蚜虫取约 10 mg 为一组，每个龄期取 5 组作为生物重复，置于冻存管 −80℃ 保存。

实验所用试剂为 RNeasy® Mini 试剂盒（Qiagen 公司），Promega 反转录试剂盒，EZNA Gel Extration Kit 试剂盒（Axygen 公司），pGEM-T easy Vector（Promega 公司），大肠杆菌 *Escherichia coli* DH 5α 宿主菌（Tiangen 公司）。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

用 RNeasy® Mini 试剂盒提取豌豆蚜各龄期总 RNA：取 −80℃ 保存的各龄期蚜虫置 2 mL RNase-free 管中；在通风橱中加 600 μL 裂解液（Buffer RLT）和 6 μL β-巯基乙醇研磨；剧烈震荡，静置 5 min；常温下 13 000 r/min 离心 5 min；其他操作步骤参照试剂盒提供的标准程序。电泳检测有无降解，马上进行下一步。

反转录前 DNase 处理：加入下列试剂：RNA 30 μL，10 × Buffer 5 μL，DNase 1 μL，Nuclease-free water 14 μL，慢慢混匀后，在 37℃ 孵育 20 ~ 30 min。向体系中加入 5 μL DNase Inactive Reagent，慢慢混匀后（2 ~ 3 次），在室温下孵育 2 min；10 000 g 离心 5 min，将上清吸到另一 RNase-free 管中备用。分光光度计下测量其浓度，以便在反转录的过程中进行定量。

cDNA 第一链的合成：取 1 μg RNA 进行反转录合成第一链 cDNA，实验步骤参照 Promega 反转录试剂盒说明书。

1.3 基因克隆及测序

根据豌豆蚜基因组信息，在基因家族各个成员的 UTR 区或 ORF 区设计 PCR 引物（表 1），从 cDNA 文库中特异性扩增各个成员。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 体系为：50 μL 反应体系中含有 10 × LA PCR Buffer（with Mg^{2+}）8 μL，dNTP（2.5 mmol/L）5 μL，引物（10 mmol/L）和按 1.2 所述合成的 cDNA 各 1 μL，LA Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL，去离子水 33.5 μL。反应条件为：94℃ 预变性 5 min，然后 94℃ 变性 30 s，55 或 56℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 40 s ~ 1 min，共 35 个循环，最后 72℃ 延伸 5 min。

表 1　基因 PCR 扩增引物和产物信息

Table 1　Primers and products of PCR amplification

引物序列(5′-3′) Primer sequence	产物大小(bp) Product size	ORF 长度(bp) ORF length	产物 GenBank 登录号 GenBank accession number of product
F：AATCACAGCAATAATACACATAC R：ATAATTTGCATACCACTGTCAC	773	399	XP_003244694
F：GGTTAGTCAATCAGCTCCGT R：TAATTTGCGTACCACTACCAC	819	399	XP_003243676
F：GAGTCAGTCAATCAGCTCCG R：AACTGATCCCAGCCACTATC	352	387 *	BAH 70645
F：GAGTCAGTCAATCAGCTCCG R：CCTTCGTGCATTCGTTGTC	314	321 *	NP_001156276
F：ACATATATATAAATCCAGTCGAC R：TCGGAAGGGCATACCACTGC	731	384	XP_003240468
F：TTGTACGGATCCGACGAAGA R：ATTATAATCTCACGGCGGATG	176	393 *	XP_003244691
F：GCGATCTACTGAAGAGCAGT R：CAAATATGGTACACGTAGTCCA	590	390	JN092371
F：CCACCGAGAAGCAGCAGTTT R：TGCACATTTTCAACGCGTCC	350	393 *	XP_003242394
F：CTGCAAGCGAACGACCAAGC R：TAGTCTACCTACCACTGCTG	595	393	XP_003244696
F：GTACTGCATATTATTATAGGTAAG R：AAACGGTGAACGTGCTGGC	454	390	JN092373
F：ATCGACTTCGACACTGCAAG R：GTGCTGGCTGGCACCGTAC	505	372	JN092374
F：GCTCGCATTGTCATATTGGTT R：GAGGGTCGTACCTGGTTTCG	225	186 *	JN092375
F：CCACGACCACGTGGTTACGT R：GTACGGAGCTTACTTGCTCC	868	354	JN092372
F：TCATTCACGGAACAACTTCG R：TATACCTAATCTCACAACGGC	381	384 *	XP_003242391
F：TCGTTACCCTCGGAAAGTC R：GTTGGCATAAGGTGGTTGT	108	408	NM_001126221 (L27)

ORF：开放阅读框 Open reading frame.　* 与豌豆蚜基因组比对获得完整的开放阅读框 Complete open reading frame according to the genome of *Acyrthosiphon pisum*.

PCR 产物经胶回收和纯化后(EZNA Gel Extraction Kit 试剂盒)，连接到 pGEM-T easy Vector，并转化至大肠杆菌 DH5α 宿主菌。经蓝白斑筛选后的阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序，每个基因至少送 3 个克隆测序。

1.4　Semi-QRT-PCR 反应体系与条件

在 0.25 mL EP 管中，依次加入下列组分：10 × LA PCR Buffer(with Mg^{2+}) 5 μL，dNTP(2.5 mmol/L) 4 μL，上游引物(10 mmol/L) 1 μL，下游引物(10 mmol/L) 1 μL，cDNA 1 μL，LA Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL，补足去离子水至 50 μL，混匀短暂离心。

目标基因反应条件为 94℃ 预变性 5 min；然后 94℃ 变性 30 s，55/56℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72℃ 再延伸 5 min。

内标基因 *L27* 反应条件仅 55℃ 退火 30 s，共 29 个循环，其余同上。

PCR 产物用 1% 或 2%(不足 400 bp 的产物)的琼脂糖凝胶电泳检测，在凝胶成像系统下观察并拍照。

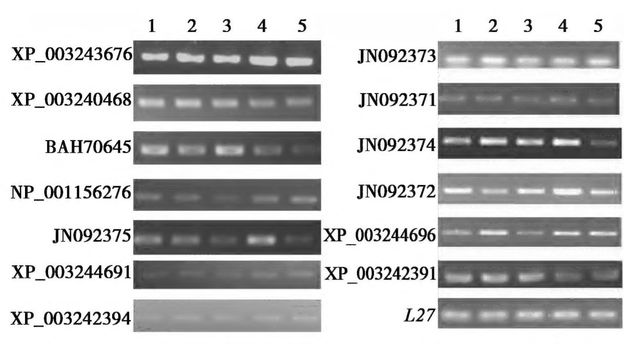


图 4 半定量 RT-PCR 检测未知功能家族 13 个成员在豌豆蚜不同发育阶段的表达

Fig. 4 Expression of 13 genes of the unknown family in *Acyrthosiphon pisum* at different developmental stages detected by Semi-QRT-PCR

1 –5：分别为 1 –4 龄若蚜和成蚜 1st to 4th instar nymphs and adult, respectively; *L27*：内参基因 Inner control.

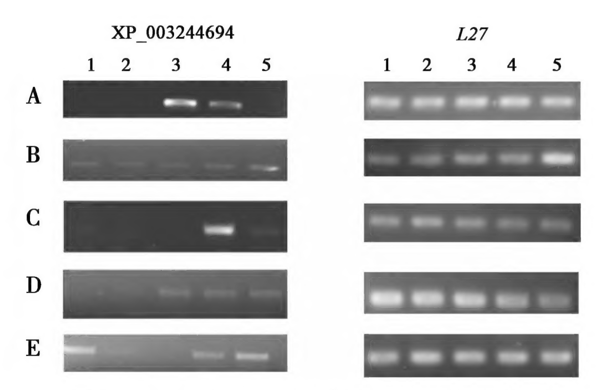


图 5 半定量 RT-PCR 检测 XP_003244694 在豌豆蚜不同发育阶段的表达

Fig. 5 Expression of XP_003244694 in *Acyrthosiphon pisum* at different developmental stages detected by semi-QRT-PCR

1 –5：分别为 1 –4 龄若蚜和成蚜 1st to 4th instar nymphs and adult, respectively; A –E：5 个生物学重复 Five biological replicates; *L27*：内参基因 Inner control.

害农作物的一类主要害虫，刺吸式害虫的防治一直是农业领域的研究热点和难点，对其唾液成分的鉴定及功能研究，可为防治刺吸式害虫提供新的思路和方法，如通过干扰唾液腺重要蛋白的表达来抑制蚜虫的取食或传毒。

这个蛋白家族富含半胱氨酸，有 14 个半胱氨酸非常保守，有可能在分子内或分子间形成二硫键，蛋白以单体或多聚体形式存在。对于含有 15 个半胱氨酸的成员，通过分子间二硫键形成多聚体的可能性非常大，因此这个家族可能存在多种分子形态。另外，有 6 个半胱氨酸形成 3 个保守的 CXXC 结构域，这个结构域是巯基氧化还原酶的活性区(Chivers *et al*., 1997)，也是 DNA 胞嘧啶甲基化酶结合未甲基化的 CpG 的结构域(Pradhan *et al*., 2008)，由此推测这个家族可能具有氧化还原酶或 DNA 甲基化酶的功能。

这个蛋白家族的进化方式多种多样。除了含有不同数目的半胱氨酸改变分子形态，还可通过可变性剪切产生不同长度的蛋白，通过提前终止翻译使蛋白长度大大缩短可能导致功能丧失，通过信号肽的改变影响蛋白在蚜虫体内的定位，这些进化的多样性都有可能使这个蛋白家族发挥多种生物学功能，参与蚜虫多种生命现象的调控。每个成员担负的生理功能需要进一步研究。

用 Semi-QRT-PCR 研究发现这个家族在蚜虫整个生命周期都有表达，没有发育阶段特异性，而在唾液腺 EST 库检测到的几个成员在进化分析中聚在一起，表明它们的进化关系很近。由此推测，这个家族可能在蚜虫不同组织间有差异表达，或具有组织特异性。另外，唾液腺表达的基因 XP_003244694 在不同发育阶段的表达不稳定，可能有其他因素影响它的表达，需要实验进一步验证。Semi-QRT-PCR 是近年来常用的一种灵敏、简捷及特异性高的基因表达水平的检测方法(Cottrez *et al*., 1994；吴安慧等，2006)，为避免 RNA 提取、加样、测定、cDNA 合成及 PCR 反应过程中的某些系统误差和人为误差，用 Semi-QRT-PCR 分析基因 mRNA 相对表达水平时必须要有对照即内参(Udvardi *et al*., 2008)。由于用 Semi-QRT-PCR 法分析基因表达水平的影响因素较多(Freeman *et al*., 1999；Marone *et al*., 2001)，所以这个方法只能粗略地反映基因表达的相对变化，若要精确地计算基因的表达量还需利用实时荧光 PCR 等技术。

参 考 文 献 (References)

Carolan JC, Caragea D, Reardon KT, Mutti NS, Dittmer N, Pappan K, Cui F, Castaneto M, Poulain J, Dossat C, Tagu D, Reese JC, Reeck GR, Wilkinson TL, Edwards OR, 2011. Predicted effector molecules in the salivary secretome of the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*): a dual transcriptomic/proteomic approach. *J. Proteome Res*., 10: 1505 –1518.

Chen MS, Fellers JP, Stuart JJ, Reese JC, Liu X, 2004. A group of related cDNAs encoding secreted proteins from Hessian fly [*Mayetiola destructor* (Say)] salivary glands. *Insect Molecular Biology*, 13(1): 101 –108.

Chivers PT, Prehoda KE, Raines RT, 1997. The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry*, 36(14): 4061 –4066.

Cottrez F, Auriault C, Capron A, Groux H, 1994. Quantitative PCR:

validation of the use of a multispecific internal control. *Nucl. Acids Res.*, 22(13): 2712 – 2713.

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE, 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26(1): 112 – 125.

Gong YJ, Shi BC, Lu H, Zhang SL, Wei L, 2006. Effects of temperatures on the development and fecundity of three species of aphids. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21(5): 96 – 98. [宫亚军, 石宝才, 路虹, 张胜利, 魏蕾, 2006. 温度对3种蚜虫生长发育及繁殖的影响. 华北农学报, 21(5): 96 – 98]

James CKN, Perry KL, 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, 5(5): 505 – 511.

Kazzazi M, Bandani AR, Hosseinkhani S, 2005. Biochemical characterization of α-amylase of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Entomological Science*, 8: 371 – 377.

Marone M, Mozzetti S, Ritis DD, Pierelli L, Scambia G, 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online*, 3(1): 19 – 25.

Pradhan M, Estève PO, Chin HG, Samaranayke M, Kim GD, Pradhan S, 2008. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry*, 47(38): 10000 – 10009.

The International Aphid Genomics Consortium, 2010. Genome sequence of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *PLoS Biology*, 8(2): e1000313.

Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR, 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7): 1736 – 1737.

Wu AH, Zhang SQ, Deng XP, Shan L, 2006. Expression of *PIP2-5* in maize root systems under water deficit. *Plant Physiology Communications*, 42(3): 457 – 460. [吴安慧, 张岁岐, 邓西平, 山仑, 2006. 水分亏缺条件下玉米根系 *PIP2-5* 基因的表达. 植物生理学通讯, 42(3): 457 – 460]

Yan Y, Liu WX, Wan FH, 2008. Roles of salivary components in piercing-sucking insect-plant interactions. *Acta Entomologica Sinica*, 51(1): 537 – 544. [严盈, 刘万学, 万方浩, 2008. 唾液成分在刺吸式昆虫与植物关系中的作用. 昆虫学报, 51(1): 537 – 544]

Yin HD, Huang CH, Xue K, Wang RJ, Yan FM, 2006. Roles of insect salivary components in insect-plant interactions. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 843 – 849. [殷海娣, 黄翠虹, 薛堃, 王戎疆, 闫凤鸣, 2006. 昆虫唾液成分在昆虫与植物关系中的作用. 昆虫学报, 49(5): 843 – 849]

（责任编辑：赵利辉）